

La présente invention est relative à un nouveau procédé de production de fractions natives de Leishmania et aux propriétés biologiques et biochimiques des fractions natives obtenues par ce procédé.

5 Par "activité immunogène" on entend dans ce qui va suivre une activité qui provoque une réponse de la part des cellules impliquées dans le système immunitaire.

Des fractions polypeptidiques de Leishmania (parasites du genre Leishmania responsables de maladies parasitaires humaines graves largement répandues dans les deux hémisphères) de poids moléculaires de l'ordre de 25 kD, 40 kD, 70 kD et 113 kD sont connues par le Brevet Français n° 84 15079 publié sous le n° 2 570 947 et leurs propriétés antigéniques ont été décrites dans ce Brevet, en particulier 15 l'activité immunogène de l'antigène de 70 kD, qui serait présent dans toutes les souches de Leishmania étudiées dans ce Brevet. Selon ce dernier, ces fractions polypeptidiques sont obtenues à partir de lysats des parasites susdits ou de surnageants de milieux de culture de ces 20 parasites, dont les fractions polypeptidiques sont séparées par électroéluion de la région d'un gel de polyacrylamide-SDS sur lequel ont été séparés les différents antigènes du ou des parasites, laquelle région correspond à une fourchette de poids moléculaires. Ce procédé, cependant, ne 25 permet d'obtenir et d'étudier que des fractions dénaturées, qui ne sont, au demeurant, obtenues qu'en faibles quantités.

Il a pu être établi ultérieurement que les fractions polypeptidiques antigéniques identifiées dans le Brevet Français 2 570 947 susceptibles d'être mises en 30 oeuvre pour la production de compositions vaccinales contre les leishmanioses, sont des glycoprotéines présentant respectivement des poids moléculaires de l'ordre de 70 kD (et des groupes glucose et mannose), de l'ordre de 20 kD ou de 30-32 kD (et des groupes fucose et α -D-N-acétyl-galactosamine), et peuvent être isolées à partir de lysats de 35 diverses espèces de Leishmania, en procédant comme décrit

dans le Brevet Français 85 01892 publié sous le n° 2 577 140, par dénaturation de suspensions soniquées de lysats de cultures de parasites, par du SDS et du β -mercaptoéthanol à 100°C, suivie de leur fractionnement sur gel de polyacrylamide. Ce procédé, qui est praticable uniquement à l'échelle du laboratoire et n'est pas transposable à l'échelle industrielle, donne lieu à des fractions dénaturées, contaminées par le SDS, puisque traitées par du SDS, du β -mercaptoéthanol et chauffées à 100°C pendant 5 minutes.

10 La présente invention s'est fixé pour but de pourvoir à des fractions natives (non dénaturées) de Leishmania, présentant des propriétés immunogènes et en particulier une activité immunogène protectrice in vivo et une activité lymphoproliférative, c'est-à-dire une
15 activité mitogène sur les lymphocytes et une activité d'induction d'une activité interleukine 1 (IL 1) ; elle s'est également fixé pour but de pourvoir à des compositions vaccinales contenant lesdites fractions natives, ainsi qu'à des produits de diagnostic de la leishmaniose, contenant
20 ces fractions.

La présente invention s'est également fixé pour but de pourvoir à un procédé d'obtention de ces fractions natives, qui exclut pour leur préparation l'utilisation de substances toxiques contaminantes telles que le SDS
25 et qui est apte à être mis en oeuvre à l'échelle industrielle.

La présente invention a pour objet des fractions extraites de Leishmania, et notamment de Leishmania infantum, caractérisées en ce qu'elles présentent des propriétés
30 immunogènes et une activité lymphoproliférative.

La présente invention a également pour objet des compositions antigéniques protectrices contre les leishmanioses, qui sont caractérisées en ce qu'elles contiennent en tant que constituant actif, au moins l'une des fractions
35 susdites.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les-
dites compositions antigéniques protectrices sont des compo-
sitions vaccinales dans lesquelles les fractions susdites
sont associées à un véhicule et/ou un adjuvant
5 d'administration approprié.

La présente invention a, de plus, pour objet
un produit de diagnostic de leishmaniose caractérisé en
ce qu'il comprend au moins l'une des fractions susdites,
mises sous une forme injectable. Le produit de diagnostic
10 conforme à l'invention permet de suivre l'évolution
ultérieure dudit sujet et de pronostiquer une résistance
à la maladie lors d'un éventuel challenge naturel ou
artificiel.

Conformément à l'invention, ce produit de diag-
15 nostic est avantageusement inclus dans un kit de diagnostic.

La présente invention a en outre pour objet un
procédé de production de fractions natives de Leishmania
présentant des activités immunogènes et lymphoprolifératives,
caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 - Une première étape dite de "préculture", au
cours de laquelle des promastigotes d'au moins une souche
appropriée de Leishmania sont mis en culture pendant une
durée appropriée, à une température de l'ordre de 27°C
 $\pm 1^{\circ}\text{C}$, à un pH de l'ordre de 6 à 8, régulé de manière appro-
25 priée, avec une pression partielle d'oxygène ($p\text{O}_2$)
convenable, de l'ordre de 10 à 80 %, sous une agitation
de l'ordre de 50 tours/minute ± 10 tours, dans un milieu
de culture approprié, pour obtenir à partir d'un inoculum
de l'ordre de 10^5 - 10^6 parasites/ml dans un fermenteur de
30 faible volume, au moins $50 \cdot 10^6$ parasites/ml;

- Une deuxième étape dite de "culture", au cours
de laquelle la préculture recueillie (de l'ordre de
 $50 \cdot 10^6$ parasites/ml) est utilisée comme inoculum dans un
fermenteur industriel (d'au moins 20 litres), est mise
35 en culture dans un milieu de culture similaire à celui

mis en oeuvre dans l'étape de préculture, à une température et à un pH similaires, la régulation du pH étant toutefois réalisée à l'aide d'un acide organique métabolisable, tel que l'acide acétique notamment, tandis que la pO_2 est de l'ordre de 50 à 100 % et que l'agitation est de l'ordre de 30 tours/minute \pm 5 tours, à l'issue de laquelle on recueille une culture de l'ordre de 65.10^6 à 80.10^6 parasites/ml ;

- Une troisième étape au cours de laquelle les parasites collectés sont centrifugés, de préférence à 6000 tours/minute pendant une durée de l'ordre de 10 minutes, pour donner un culot de parasites ;

- Une quatrième étape au cours de laquelle le culot de parasites résultant de la troisième étape est resuspendu dans un tampon approprié, de manière à obtenir une concentration de 6.10^9 parasites/ml.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, et plus particulièrement de sa quatrième étape, le culot de parasites résultant de la troisième étape, ou étape de centrifugation, est mis en suspension dans de l'acétate d'ammonium 10 à 20 mM contenant 1 % de détergent non ionique tel que Triton X100 notamment, cette suspension est centrifugée, de préférence à 6000 tours/minute environ, et le surnageant de centrifugation récupéré, tandis que le culot est remis en suspension dans environ 1/10 du volume initial de culture et soumis à sonication, puis on centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment, pour collecter un deuxième surnageant et un deuxième culot qui est également soniqué, puis à nouveau centrifugé pour collecter un troisième surnageant, les surnageants de sonication sont réunis et déposés sur une colonne de tamis moléculaire à partir de laquelle on recueille, en utilisant l'acétate d'ammonium comme éluant, des fractions dont les poids moléculaires sont évalués de manière appropriée et dont

l'activité lymphoproliférative est évaluée à l'aide de tests appropriés.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les poids moléculaires des fractions sont évalués par révélation au nitrate d'argent d'un gel PAGE-SDS.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, le milieu de culture mis en oeuvre pour la préculture et/ou pour la culture de promastigotes de *Leishmania*, est avantageusement constitué par un mélange 1:1 de milieu RPMI 1640 et de milieu 199, (milieux commercialisés par GIBCO), additionné de 2 à 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, de glutamine 2 mM, de tricine pH 7, 50 à 100 mM et d'antibiotiques appropriés (pénicilline 100 u/ml, streptomycine 100 µg/ml, kanamycine 100 µg/ml).

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, les opérations de mise en suspension et de centrifugation qui constituent la quatrième étape dudit procédé, sont réalisées de préférence à une température de l'ordre de +4°C.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, la première étape, ou étape de préculture, est supprimée, auquel cas on utilise comme inoculum 500 ml à 1 litre de la culture résiduelle provenant d'une culture précédente.

L'activité lymphoproliférative des fractions antigéniques natives de *Leishmania* conformes à la présente invention est évaluée par estimation de l'induction de la prolifération de lymphocytes par lesdites fractions, en prélevant des lymphocytes chez des donneurs humains ou animaux appropriés, en les mettant en culture dans un milieu de culture pour lymphocytes, en les mettant en contact avec les fractions antigéniques de *Leishmania* susdites

diluées à différentes concentrations, et en mesurant la prolifération des lymphocytes au bout d'une durée appropriée de culture, par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée, exprimée en cpm ou en Index de Prolifération Maximum, IPM, qui est le rapport de l'incorporation maximale mesurée pour 10^5 lymphocytes en présence de la dose optimale de la fraction considérée, à l'incorporation mesurée en l'absence de tout stimulus.

L'activité biologique des fractions extraites de Leishmania conformes à la présente invention a également été évaluée par leur capacité à induire la libération d'interleukine 1 (IL 1) par les monocytes humains.

Pour identifier les activités immunogènes des fractions natives extraites de Leishmania, conformes à la présente invention, on a tout d'abord cherché à identifier leurs activités à médiation humorale et plus précisément leur activité inductrice d'anticorps. Cette dernière a été examinée par rapport d'une part à des antigènes de nature protéique et d'autre part à des antigènes de nature glycolipidique.

Dans ce but, des souris Balb/c ont été inoculées avec une fraction conforme à l'invention et les sérums recueillis ont été incubés :

- a) pour l'obtention d'un profil d'antigène protéique, avec une immunoempreinte dudit profil antigénique sur une feuille de nitrocellulose, conformément à la technique du Western-blot;
- b) pour l'obtention d'un profil d'antigène glycolipidique, avec le chromatogramme des lipides extraits des parasites par des solvants organiques appropriés, c'est-à-dire avec l'immunoempreinte de la migration des lipides de l'organisme parasite, conformément à la méthode de MAGNANI et Al. [J. BIOL. CHEM. (1982), 257, 14365-14369 et (1986), 261, 3826-3830].

L'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention et de mise en évidence des caractéristiques des fractions obtenues par ce procédé.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 - Production de fractions antigéniques de Leishmania

A) Production de biomasse de Leishmania à l'échelle pilote pour l'industrie
Préculture

Les promastigotes de Leishmania LEM 497 sont mis en culture dans un fermenteur de 2 litres dans les conditions suivantes :

- Inoculum de 10^5 à 10^6 parasites/ml
- Température : $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- pH : $7 \pm 0,2$ régulé par de l'acide chlorhydrique
- pO_2 : 20 %
- Agitation : 50 rpm
- Milieu : 1 litre de mélange (1:1) RPMI 1640/milieu 199 (milieux commercialisés par Gibco) auquel on ajoute 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, glutamine 2 mM ; tricine pH 7, 50 à 100 mM, antibiotiques (pénicilline 100 unités/ml, streptomycine 100 $\mu\text{g/ml}$, kanamycine 100 $\mu\text{g/ml}$).

Le plateau de la culture est atteint en environ quatre jours ($50 \cdot 10^6$ parasites/ml). On utilise alors le contenu de ce fermenteur pour inoculer un fermenteur de 20 litres (SETRIC, Génie Industriel).

B) Culture en fermenteur de 20 litres

Les conditions de culture en fermenteur de 20 litres sont presque les mêmes que dans le fermenteur de 2 litres sauf que :

- 5 - l'agitation se fait avec des pales de cyto-culteur ; elle est de 30 rpm.
- la pO_2 est de 50 %.
- la régulation du pH se fait avec de l'acide acétique 1 M au lieu d'acide chlorhydrique.
- 10 - le volume de départ est de 17 litres.

Dans ces conditions, si on part d'une culture à 10^6 parasites/ml, on atteint en quatre jours un plateau jusqu'à 65.10^6 parasites/ml.

- Les parasites sont ensuite collectés stérilement
- 15 puis centrifugés (6000 rpm, .10 minutes sur rotor JA-20 Beckman) et le culot est rincé deux fois par du PBS.

Le culot des parasites ainsi obtenu est resuspendu dans un tampon défini selon les conditions ultérieures de séparation, de façon à obtenir une concentration de

20 6.10^9 parasites/ml, soit 44,5 μ g/ml en protéines dosées par la méthode de FOLIN.

C) Production de fractions natives

Les parasites sont suspendus cette fois dans de l'acétate d'ammonium 10 à 20 mM avec Triton X100 à 1 %

25 et on laisse ainsi une heure à 4°C en agitant.

Puis, on centrifuge à 4°C 10 minutes à 6000 rpm dans un rotor JA-20 (Beckman). Le surnageant est récupéré (=S₁). Le culot est resuspendu dans 1/10 du volume initial de culture et soumis à sonication 30 minutes à 4°C sur

30 un sonicateur Branson (position 1, continu, fréquence minimale de 20 Hz).

On centrifuge de nouveau 10 minutes dans les mêmes conditions que précédemment : on collecte un surnageant S₂ et le culot résultant subit un traitement analogue

35 au précédent.

Les opérations sont répétées de façon à avoir 3 surnageants S_1 , S_2 , S_3 .

Les surnageants de sonication sont réunis et déposés sur une colonne de tamis moléculaire, tel qu'un polymère d'acrylamide et de Sépharose, commercialisé sous le nom de "Sephacryl S₂₀₀", qualité "Superfine" (Pharmacia).

Les caractéristiques de la colonne sont les suivantes :

- Taille du dépôt : de 60 à 90 ml
- Température d'élution : 4°C
- Longueur : 96 cm
- Rayon : 5 cm
- Volume mort : 890 ml
- Débit : 40 ml/h à 70 ml/heure
- Elution : acétate d'ammonium 20 mM dans l'eau

On recueille 7 fractions d'après les Kav suivants avec les caractéristiques suivantes :

Fraction	Kav ($\pm 0,02$)	Teneur en protéines (Folin)	Volume (en ml)
1	0	390 $\mu\text{g/ml}$	236
2	0,43	163 $\mu\text{g/ml}$	434
3	0,75	80 $\mu\text{g/ml}$	212
4	1,06	70 $\mu\text{g/ml}$	25
5	1,24	65 $\mu\text{g/ml}$	438
6	1,54	125 $\mu\text{g/ml}$	128
7	1,92	35 $\mu\text{g/ml}$	220

Le profil d'élution classique est donné par la Figure 1 annexée dans laquelle les Kav sont donnés en abscisse et les teneurs en protéines en ordonnée, et qui montre les fractions F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5 , F_6 , F_7 . La densité optique (DO) est lue à 260 nm (courbe I en trait continu de la figure 1) et à 280 nm (courbe II en traits discontinus de la figure 1).

Comme on le sait, K_{av} exprime le rapport suivant :

$$K_{av} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

où :

5 V_E = volume d'élution

V_T = volume total

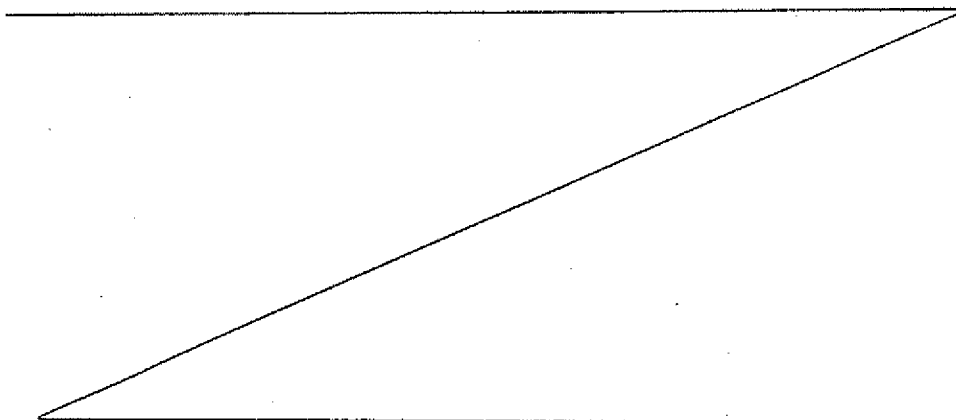
V_0 = volume mort.

La répartition des espèces moléculaires est donnée par caractérisation sur gel de polyacrylamide en présence
10 de SDS, comme représenté à la Figure 2 annexée dans laquelle les numéros des fractions figurent en abscisse et les poids moléculaires en ordonnée ; les fractions présentant une activité protectrice sont celles dont le K_{av} est égal ou supérieur à 1.

15 Pour évaluer la répartition des espèces moléculaires, on a procédé comme suit :

Les différentes fractions ont été déposées sur un gradient de 5 à 20 % de gel PAGE-SDS (Phast Gel Pharmacia) et leur profil électrophorétique comparé par rapport à
20 des marqueurs de poids moléculaires (PM) de référence.

Ces marqueurs de référence, fournis par la Société PHARMACIA (Suède), sont présentés sous forme de kits de calibrage de hauts poids moléculaires (HMW) et de bas poids moléculaires (LMW), respectivement, dont la composition
25 est la suivante :



A. Kit de calibrage de hauts poids moléculaires (HMW)

5	Protéine	Poids moléculaire	Poids moléculaire des sous-unités	Source
10	Thyroglobuline	669 000	330 000	Thyroïde de porc
	ferritine	440 000	18 500 (220 000)	rate de cheval
	catalase	232 000	60 000	foie de boeuf
	lactate-déshydrogénase	140 000	36 000	coeur de boeuf
15	Albumine	67 000	67 000	sérum bovin

B. Kit de calibrage de bas poids moléculaires (LMW)

20	Protéine	Poids moléculaire des sous-unités	Source
25	Phosphorylase B	94 000	muscle de lapin
	albumine	67 000	sérum bovin
	ovalbumine	43 000	blanc d'oeuf
	anhydrase carbonique	30 000	érythrocytes bovins
30	Inhibiteur de trypsine	20 100	soja
	α -lactalbumine	14 400	lait de vache

La coloration du gel est faite par du nitrate d'argent.

Le procédé de coloration au nitrate d'argent consiste en :

- 5 1. une fixation du gel avec un acide et de l'alcool,
2. une réaction au bichromate/acide nitrique,
3. une réduction du nitrate d'argent se traduisant
10 par des taches noires aux niveaux des molécules réductrices situées dans le gel.

Dans le Tableau I ci-après, les numéros se réfèrent aux numéros de fractions et la Figure 2 représente la caractérisation desdites fractions sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (en abscisse les numéros des fractions, 15 en ordonnée, les poids moléculaires), selon la méthode de LAEMMLI [Nature, 277, p. 680 (1970)].

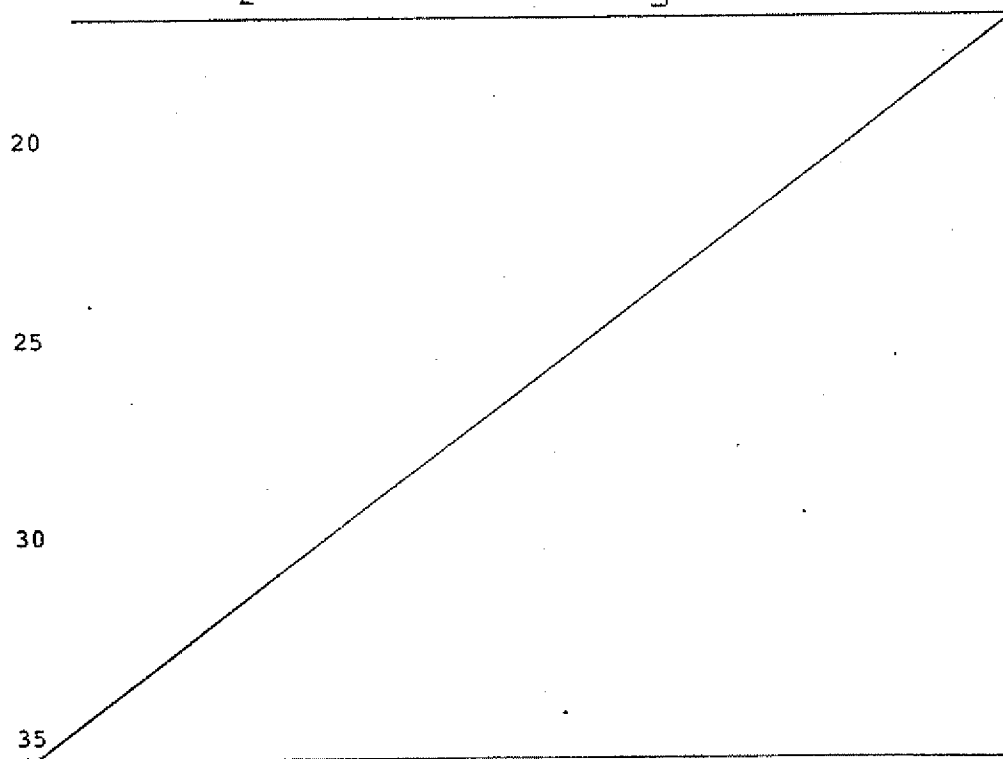


TABLEAU I

Caractérisation sur un gradient de gel de 5 à 20 %
de polyacrylamide en présence de SDS
(selon LAEMMLI) des fractions obtenues

5	Fraction n°	Poids moléculaires des bandes colorées en kilodaltons $\pm 10 \%$	
10	1	210	
		160	
		21 à 17,5	
15	2	79	
		24,5	*
		22,4*	
		21,1*	
		18,3	
20	3	81	
		56,6	
		41,4	
		35,1*	
		32,1	
		18,7	
25	4	16,6	
		78,7	
		56,6	
30	5	41,4	
		91,3	
		83,5	
30	6	90,2	
		83	
		71,9	
30	7	90,2	
		83	

* bandes majeures.

Par ailleurs on a caractérisé la nature glucidique des différentes fractions. Pour cela, des lectines ont été conjuguées à la peroxydase selon la technique de J.L. GUESDON et Col. [J. Immunol. Methods 39 (1980), p. 1-13].

Ces conjugués ont été incubés sur les profils électrophorétiques de fractions de *Leishmania infantum*, transférés sur nitrocellulose.

La composition des fractions F₁ à F₆ en sucres est ainsi établie :

Lectine testée	POIDS MOLECULAIRES DE (en KD)					
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆
Lectine d'arachide (ou PNA) (β -D-galactose)		16 18				nt
concanavalline A (mannose-glucose)		16	< 14	< 14		nt
Ulex europaeus I (L. fucose)		16 18	< 14 25 60 75	< 14 60 75		nt

nt = non testé

La PNA appelée aussi lectine d'arachide (peanut agglutinin) est fournie par la Société BIOSYS (Compiègne, France), la concanavalline A par SIGMA, l'Ulex Europaeus I par la Société américaine VECTOR, et la peroxydase est fournie par BOEHRINGER-MANNHEIM.

La fraction F₂ contient des groupes β -D-galactose ;
les fractions F₂, F₃, F₄ contiennent des groupes mannose-glucose ;
les fractions F₂, F₃, F₄ contiennent également des groupes L-fucose.

EXEMPLE 2 - Analyse de la réponse humorale consécutive à l'injection des fractions de *Leishmania infantum* conformes à l'invention chez la souris Balb/c.

5 La Figure 3 annexée représente un Western blot obtenu à partir d'un profil électrophorétique de la souche LEM 497 C (*Leishmania infantum*) transféré sur nitrocellulose et soumis à une immunoempreinte avec des sérums de souris.

Ces souris ont reçu au préalable 3 injections
10 successives à 15 jours d'intervalle avec 100 µg de l'une des fractions conformes à l'invention, dans 100 µl d'adjuvant de Freund (complet pour la première injection puis incomplet pour les autres injections).

Dans la Figure 3, les numéros 0 et 13 représentent
15 le profil des transferts, colorés à l'encre de Chine.

Les numéros : sont relatifs aux bandelettes :

- | | | | |
|----|------|--|----------------------------------|
| | 1 } | | |
| | 2 } | souris A | |
| | 3 } | | immunisées contre la fraction F2 |
| | 4 } | souris B | |
| 20 | 5 } | | |
| | 6 } | souris immunisée contre la fraction F3 | |
| | 7 } | | |
| | 8 } | souris A | |
| | 9 } | | immunisées contre la fraction F4 |
| | 10 } | souris B | |
| 25 | 11 } | | |
| | 12 } | souris non immunisées | |

Les nombres pairs correspondent aux sérums dilués 1/200

Les nombres impairs correspondent aux sérums dilués 1/50.

Seules les souris immunisées avec la fraction "F2" fabriquent
30 des anticorps contre des antigènes de plus de 330 kD et d'une région de 15-14 kD, ce qui signifie que les autres fractions (F3 et F4) sont plus difficilement inductrices d'anticorps.

EXEMPLE 3 - Tests d'évaluation de l'activité lymphoproliférative de fractions antigéniques de
35 *Leishmania*

1. Induction de la prolifération des lymphocytes humains par des fractions de Leishmania

Les fractions ont été dissoutes dans du milieu de culture pour lymphocytes humains (RPMI 1640, Pénicilline, Streptomycine, 10 % sérum humain AB⁺), dans des conditions stériles. Des lymphocytes humains ont été préparés par centrifugation sur gradient discontinu de Ficoll (Histopaque, Sigma) à partir de sang périphérique de donneurs sains n'ayant pas de passé clinique connu de Leishmaniose. Ces lymphocytes ont été mis en contact avec les différentes fractions à des concentrations variables de 25 à 0,1 µg par ml de culture. La prolifération cellulaire est mesurée après 6 jours de culture en étuve gazée à 37°C, par mesure de l'incorporation de ³H-thymidine pendant 18 heures. La prolifération observée en présence de chaque fraction est exprimée en Index de Prolifération Maximum, IPM : rapport de l'incorporation maximale mesurée pour 10⁵ lymphocytes en présence de la dose optimale de la fraction considérée, à l'incorporation mesurée en l'absence de tout stimulus. Quatre préparations de lymphocytes provenant de donneurs différents ont été utilisées. Les résultats de cette évaluation sont réunis dans le Tableau II ci-après.

TABLEAU II

IPM mesuré pour les différentes fractions isolées à l'Exemple 1

		Extrait total de Leishmanies	Fractions						
			1	2	3	4	5	6	7
Exp. n° I	14	22	6	1	nt	6	nt	5	
Exp. n° II	13	18	nt	13	17	nt	1	nt	
Exp. n° III	28	28	21	6	9	7,5	7	7,5	
Exp. n° IV	7	nt	9,5	nt	1,5	4,5	5	1,5	

nt : non testé dans cette expérience.

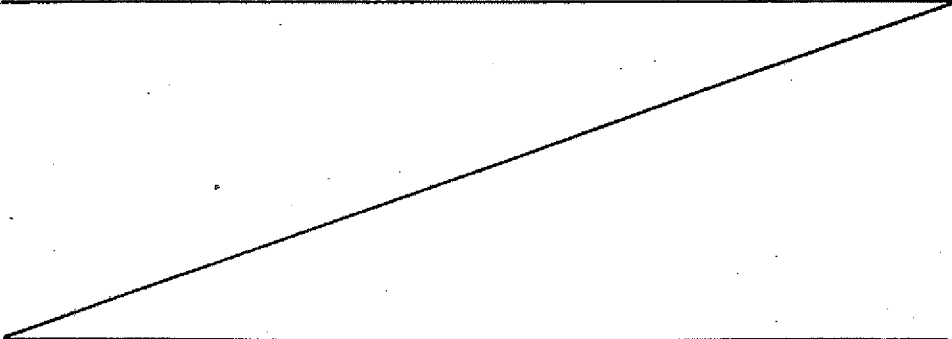
Des contrôles négatifs effectués dans les mêmes conditions avec de la sérumalbumine bovine donnent un IPM=1; des contrôles positifs avec la PHA donnent des IPM de 50 à 100 selon les préparations de lymphocytes.

5 Des activités prolifératives diverses sont observées selon les préparations de lymphocytes utilisées. Une forte activité proliférative est observée dans l'extrait total des parasites.

10 Les fractions 1, 2 et 4 présentent une activité proliférative importante (IPM de l'ordre de 10 ou plus) dans au moins deux sur trois des expériences où elles ont été testées.

2. Test de lymphoprolifération : modèle murin

Cet essai a été réalisé sur des splénocytes
15 de souris Balb/c, cultivés en microplaques en milieu RPMI 1640, 1 % de sérum de veau foetal ($0,5 \cdot 10^6$ cellules/puits). Les fractions 1 à 6 (diluées en tampon PBS) ont été testées à 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3 et 0.15 $\mu\text{g/ml}$ en comparaison avec de la Concanavaline A (ConA 2.5 $\mu\text{g/ml}$)
20 et du lipopolysaccharide (LPS 10 $\mu\text{g/ml}$, commercialisé par DIFCO). La lymphoprolifération a été estimée au Jour + 2 et au Jour + 4 par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée. Les résultats présentés sur le Tableau III ci-après sont représentatifs de deux expériences réalisées
25 dans des conditions identiques. Les 6 fractions testées ont une activité lymphoproliférative détectable. Celle-ci est optimale 48 heures après le début des cultures. Les fractions 4, 5 et 6 sont plus actives que les fractions 1, 2, 3.



18

TABLEAU III

Incorporation maximale (cpm) obtenue à :

	J + 2	J + 4
5		
PBS (diluant)	553	785
LPS (10 µg/ml)	9011	2798
10		
ConA (2.5 µg/ml)	41356	57013
	1	2780 (2.5)*
	2	1743 (1.2)
15		
Fractions	3	3953 (0.3)
	4	4916 (2.5)
	5	6528 (20)
20		
	6 + 7 cumulées	7322 (20)

* Concentration (µg/ml) pour laquelle a été obtenue l'incorporation maximale.

3. Test d'induction d'une activité interleukine 1 (IL 1)

La capacité des fractions de Leishmania à induire la libération d'interleukine 1 (IL 1) par les monocytes humains a été recherchée. Dix microgrammes de chacune d'entre elles ont été ajoutés à 5×10^5 monocytes humains/0.5 ml milieu RPMI 1640 sélectionnés par adhérence à partir des cellules mononucléées obtenues après centrifugation du sang total sur Ficoll-Histopaque. Après 24 heures de culture, les surnageants sont récupérés et testés pour leur activité

IL 1 à l'aide du test de comitogénicité sur des thymocytes de souris C3H/HeJ en présence de doses suboptimales de concanavaline A. Il est apparu, ainsi que cela ressort du Tableau IV ci-après, que les fractions F1 et F3 sont
5 dépourvues d'activité inductrice d'IL-1, tandis que les fractions F2, F4, F5 et F6 induisent la présence d'une activité IL-1 dans les surnageants de monocytes.

Les expériences préliminaires menées en présence de polymyxine B (PMB) [commercialisée par SIGMA], en vue
10 de neutraliser d'éventuelles contaminations en endotoxines, puissants inducteurs d'IL-1, semblent suggérer que les activités inductrices d'IL-1 observées avec les fractions F2, F4 et F5 pourraient être des propriétés intrinsèques de ces fractions.

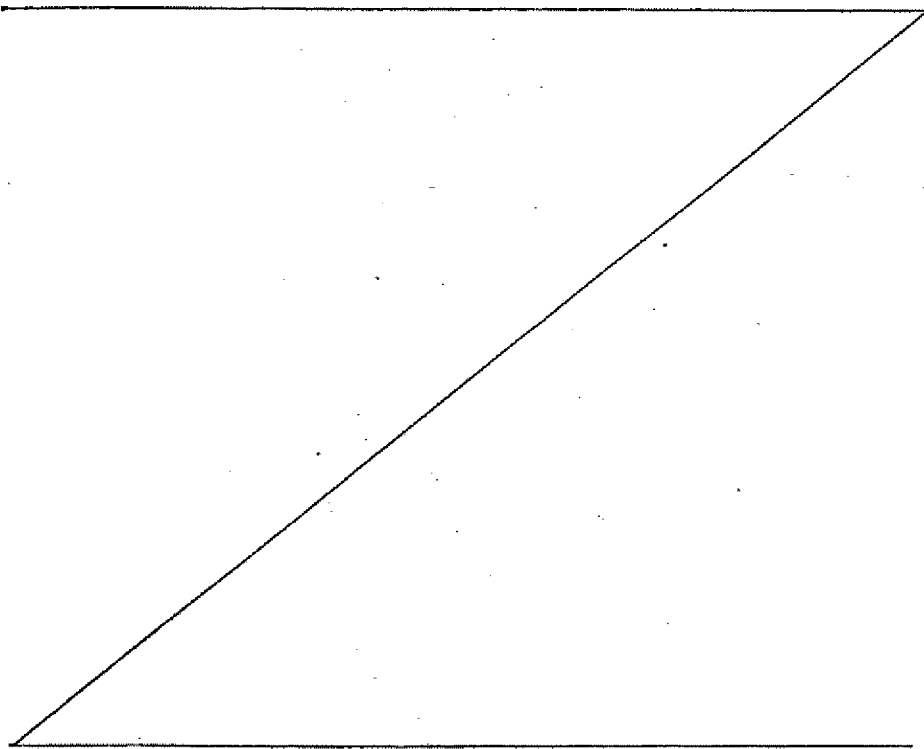


TABLEAU IV

Exp. I*

Exp. II*

		Milieu de culture RPMI	+PolymyxineB 2µg/puits	Milieu de culture RPMI	+Poly-myxineB 2µg/puits
5	O .1/40	1093	1433	1195	1091
	1/10	610	1259	920	937
10	F1 10 µg	1247	1247	1150	1195
		2333	1453	1423	1345
	F2 10 µg	4716	4989	4743	3273
		5229	5449	6517	4659
15	F3 10 µg	1482	1154	1042	1147
		1945	1167	1143	964
	F4 10 µg	7236	5326	3999	5623
		5707	5778	8544	6891
20	F5 10 µg	3923	5472	3875	4411
		8234	7837	6725	9057
	F6 10 µg	5699	5848	5058	3429
		8025	4511	6281	3833
25	LPS SE **	4022	6259	1782	7727
	1 µg	2774	7059	5032	8275
	10 µg	6422		8224	
		8335		5618	

* I : Monocytes humains provenant d'un donneur féminin de 27 ans, groupe sanguin A⁺ ; 79,5x10⁶ cellules mononuclées/50 ml sang

20% NSE⁺ (NSE = non specific esterase)

30 * II : Monocytes humains provenant d'un donneur féminin de 19 ans, groupe sanguin O⁺ ; 73,5x10⁶ cellules mononuclées/50 ml sang

20,9 % NSE⁺ (non specific esterase)

** SE : Salmonella enteridis.

EXEMPLE 4 - Test d'identification de la présence éventuelle d'anticorps antiglycolipides anti-Leishmania dans des sérums.

Des souris ont été immunisées avec les différentes fractions de Leishmania infantum. La présence éventuelle dans leur sérum d'anticorps antiglycolipides a été étudiée.

L'identification de ces anticorps a été effectuée selon la méthode décrite par MAGNANI selon laquelle les lipides du parasite sont extraits par 20 volumes d'un mélange chloroforme-méthanol-eau (5:10:3, vol/vol). L'extrait lipidique provenant de 10 à 20 mg de culot parasitaire est chromatographié sur des plaques HP-TLC (gel de silice 60, Merck), dans un solvant chloroforme-méthanol-KCl 0,25 % H₂O (50:40:10, vol/vol). Le chromatogramme est séché puis immergé pendant 2 minutes dans une solution de polyisobutyl-méthacrylate (Polysciences) à 0,1 % dans l'hexane. Après séchage à l'air, le chromatogramme est vaporisé avec du tampon phosphate (tampon A), puis immergé pendant 20 minutes dans un tampon Tris ou tampon B (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, 1 % Sérumalbumine bovine).

Puis la plaque est incubée dans le sérum à tester dilué au 1/50^e dans le tampon B, pendant une heure à la température du laboratoire. Le chromatogramme est ensuite lavé dans 4 bains successifs de tampon B puis recouvert d'anticorps de chèvre anti-Immunoglobulines /IgG (H+L)/ de souris marqués à l'Iode 125 (Iodogen). Après une heure d'incubation le chromatogramme est lavé dans quatre bains successifs de tampon A, séché, puis mis en contact avec un film pour autoradiographie Kodak XAR 5.

Les sérums des souris immunisées avec les fractions 2, 3 et 4 ont été testés. Les sérums des animaux immunisés avec les fractions 2 et 3 ne présentent aucune réactivité sur les lipides extraits des Leishmanies. Par contre, les sérums des souris immunisées avec la fraction 4 contiennent des anticorps spécifiques d'un lipide extrait du parasite.

Ce lipide, après chromatographie, apparaît comme une double bande, aspect classique de la migration des glycolipides. Ce lipide antigénique se situe, après chromatographie dans le solvant utilisé, entre les Gangliosides GM3 et GM1.

- 5 Ce test contribue à la mise en évidence de la composition chimique de la famille d'immunogènes conforme à la présente invention.

EXEMPLE 5 - Evaluation des activités immunogènes in vivo de fractions de Leishmania LEM 497 isolées sur tamis moléculaire, contre une infection leishmanienne.

Des lots de 5 souris Balb/c (IFFA CREDO, FRANCE) de 20 g ont subi le protocole d'immunisation suivant ; chacune des souris a été traitée comme suit :

15 3 injections sous-cutanées dorsales de fractions de L. infantum (LEM 497), espacées chacune de 15 jours, puis 10 jours après, un challenge de 2.10^7 promastigotes de L. mexicana mexicana (LV 4) en injection sous-cutanée à la base de la queue.

20 Les lots de souris sont les suivants et les doses indiquées sont celles administrées à chacune des souris :

lot Nature de l'injection

- | | |
|---|---|
| 1 | Surnageant de sonication de L. infantum
320 μ g à la première injection puis 160 μ g pour les deux autres avec 50 μ g de MDP (BIOSYS, COMPIEGNE, FRANCE), soit 640 μ g de surnageant par souris de 20 g. |
| 2 | Toutes les fractions de colonne réunies moins la fraction F4 (Kav = 1,06)
120 μ g à la première injection puis 60 μ g pour les deux autres avec 50 μ g de MDP. |
| 3 | Fraction F4 seule
200 μ g à la première injection puis 100 μ g pour les deux autres, avec 50 μ g de MDP, soit 400 μ g de surnageant par souris de 20 g. |

4 Eau physiologique
Avec 50 μ g de MDP

5 Eau physiologique
Sans MDP

5 Après le challenge infectieux, les souris sont examinées au site d'injection du challenge infectieux.

Le résultat des observations est le suivant : on observe l'induration au point d'inoculation et son évolution ultérieure avec, plus tard, la mort éventuelle de l'animal, les croix traduisant la croissance de l'induration.

TEMPS	*	J + 21					J+42 après challenge					J+60 après challenge				
		0	+	++	+++	Ulc.	0	+	++	+++	Ulc.	0	+	++	+++	Ulc.
LOT																
15 Lot 1 Lysat total + MDP		1	2	4			0	2	3	2					6	1
20 Lot 2 toutes les frac- tions -F ₄ + MDP		3	4	1			2	5	1	0					1	7
20 Lot 3 F ₄ + MDP		4	3	1			2	2	3		1		1	4		3
25 Lot 4 MPD seul		1	4	0			5								2	3
25 Lot 5 PES sans MDP		1	4				2	2	1						2	3

* 0 = rien

+ = induration jusqu'à 3 mm

30 ++ = induration 3 - 5 mm

+++ = induration 5 - 7 mm Ulc. = ulcération

Ce résultat préliminaire montre l'apparition de lésions associée à la fraction F₄ (Kav = 1,06) (lot n° 3 et lot n° 1) pendant les 40 premiers jours suivant le challenge.

35 Une stabilisation, puis une régression dans l'évolution

ultérieure des lésions par rapport aux autres lots, est à noter.

Cet effet ne semble pas apparaître lorsque la fraction F4 est absente des fractions injectées (lot n° 2).

- 5 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'es-
- 10 prit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1.- Fractions natives caractérisées en ce qu'elles sont extraites de Leishmania.

5 2.- Fractions natives selon la revendication 1, caractérisées par leurs propriétés immunogènes et leur activité lymphoproliférative.

3.- Fractions natives selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisées en ce qu'elles sont extraites de Leishmania infantum.

10 4.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de l'ordre de 0, un poids moléculaire -évalué sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE-SDS), selon la méthode de LAEMMLI-comprenant, après coloration au nitrate
15 d'argent, des bandes de l'ordre de 21, 160 et 210 KD, une composition en glucides -évaluée sur des profils électrophorétiques transférés sur nitrocellulose - présentant une bande à < 14 KD contenant du β -D-galactose, du mannose et du glucose et du L-fucose, respectivement, laquelle
20 fraction est dénommée "F₁".

5.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de l'ordre de 0,43, un poids moléculaire comprenant, après coloration au nitrate d'argent, des bandes majeures
25 de l'ordre de 21,1 KD, 22,4 KD, 24,5 KD et des bandes de l'ordre de 18,3 KD et 79 KD, une composition en glucides présentant une bande de l'ordre de 16 et 18 KD caractéristique du mannose et du glucose, et des bandes à 16 et 18 KD caractéristiques du L-fucose et du
30 β -D-galactose, laquelle fraction est dénommée "F₂".

6.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de 0,75, un poids moléculaire, évalué sur PAGE-SDS, comprenant, après coloration au nitrate d'argent, une bande
35 majeure de l'ordre de 35,1 KD et des bandes de l'ordre

de 16,6, 18,7, 32,1, 41,4, 56,6 et 81 KD, une composition en glucides présentant des bandes \leq 14 KD caractéristiques respectivement du mannose et du glucose et des bandes \leq 14 KD, 25 KD, 60 KD et 75 KD caractéristiques du L-fucose, laquelle 5 fraction est dénommée "F₃".

7.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de l'ordre de 1,06, un poids moléculaire comprenant, après coloration au nitrate d'argent, des bandes de l'ordre 10 de 41,4, 56,6 et 78,7 KD, une composition en glucides présentant des bandes à \leq 14 KD, caractéristiques respectivement du mannose et du glucose et une bande \leq 14 KD, 60 KD et 75 KD caractéristiques du L-fucose, laquelle fraction est dénommée "F₄".

15 8.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de l'ordre de 1,24, un poids moléculaire comprenant, après coloration au nitrate d'argent, des bandes de l'ordre de 83,5 KD et 91,3 KD, laquelle fraction est dénommée "F₅".

20 9.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de l'ordre de 1,54, un poids moléculaire comprenant, après coloration au nitrate d'argent, des bandes de l'ordre de 71,9 KD, 83 KD et 90,2 KD, laquelle fraction est dénommée 25 "F₆".

10.- Fraction native selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente un Kav de l'ordre de 1,92, un poids moléculaire comprenant, après coloration au nitrate d'argent, des bandes de l'ordre 30 de 83 KD et 90,2 KD, laquelle fraction est dénommée "F₇".

11.- Compositions antigéniques protectrices contre les leishmanioses, caractérisées en ce qu'elles contiennent en tant que constituant actif, au moins l'une des fractions natives extraites de Leishmania, selon l'une quelconque 35 des revendications 1 à 10.

12.- Compositions antigéniques protectrices selon la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par des compositions vaccinales dans lesquelles au moins l'une des fractions selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 est associée à un véhicule d'administration approprié, et éventuellement à un adjuvant.

13.- Produit de diagnostic de leishmaniose caractérisé en ce qu'il contient au moins l'une des fractions natives extraites de Leishmania, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

14.- Kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une dose utile pour la réalisation d'un test de diagnostic de leishmaniose, d'au moins une fraction selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, ainsi que les diluants et tampons nécessaires à la réalisation dudit test.

15.- Fractions natives selon au moins l'une quelconque des revendications 4 et/ou 5 et/ou 7, caractérisées par leur activité lymphoproliférative sur des cultures de lymphocytes humains.

16.- Fractions natives selon au moins l'une quelconque des revendications 7 et/ou 8 et/ou 9, caractérisées par leur activité lymphoproliférative sur des cultures de lymphocytes murins.

17.- Fractions natives selon au moins l'une quelconque des revendications 5 et/ou 6, caractérisées par leur activité immunogène.

18.- Fractions natives selon au moins l'une quelconque des revendications 5 et/ou 7 et/ou 8 et/ou 9, caractérisées par leur activité de libération d'interleukine 1 (IL 1) sur les monocytes humains.

19.- Fraction native protectrice selon au moins l'une quelconque des revendications 7, 10, 15, 16, 18, caractérisée en ce qu'elle est extraite de Leishmania infantum.

20.- Procédé de production de fractions de Leish-

mania présentant des activités immunogènes et lymphoprolifératives, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 15 à 19, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

- 5 a) étape dite de préculture
 b) étape dite de culture
 c) étape de récolte
 d) étape de concentration.

- 21.- Procédé selon la revendication 20, caractérisé
10 - en ce qu'au cours de la première étape dite de "préculture", des promastigotes d'au moins une souche appropriée de Leishmania sont mis en culture pendant une durée appropriée, à une température de l'ordre de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, à un pH de 6 à 8 régulé de manière appropriée, avec
15 une pression partielle d'oxygène (pO_2) convenable, de l'ordre de 10 à 80 %, sous une agitation de l'ordre de 50 tours/minute ± 10 tours, dans un milieu de culture approprié, pour obtenir à partir d'un inoculum de l'ordre de 10^5 - 10^6 parasites/ml dans un fermenteur de faible volume, au moins
20 $50 \cdot 10^6$ parasites/ml;

- en ce qu'au cours de la deuxième étape dite de "culture", la préculture recueillie (de l'ordre de $50 \cdot 10^6$ parasites/ml) est utilisée comme inoculum dans un fermenteur industriel (d'au moins 20 litres) et est mise
25 en culture dans un milieu de culture similaire à celui mis en oeuvre dans l'étape de préculture, à une température et à un pH similaires, la régulation du pH étant toutefois réalisée à l'aide d'un acide organique métabolisable tel que l'acide acétique notamment, tandis que la pO_2 est de
30 l'ordre de 50 à 100 % et que l'agitation est de l'ordre de 30 tours/minute ± 5 tours, à l'issue de laquelle on recueille une culture de l'ordre de $65 \cdot 10^6$ - $80 \cdot 10^6$ parasites/ml;

- en ce qu'au cours de la troisième étape, les
35 parasites collectés sont centrifugés, de préférence à 6000

tours/minute pendant une durée de l'ordre de 10 minutes, pour donner un culot de parasites ;

- en ce qu'au cours de la quatrième étape, le culot de parasites résultant de la troisième étape est
5 resuspendu dans un tampon approprié, de manière à obtenir une concentration de 6.10^9 parasites/ml.

22.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisé en ce que sa quatrième
10 étape consiste en ce que le culot de parasites résultant de la troisième étape, ou étape de centrifugation, est mis en suspension dans de l'acétate d'ammonium 10 à 20 mM contenant 1 % de détergent non ionique tel que Triton X100, notamment, cette suspension est centrifugée, de préférence
15 à 6000 tours/minute environ, et le surnageant de centrifugation récupéré, tandis que le culot est remis en suspension dans environ 1/10 du volume initial de culture et soumis à sonication, puis on centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment, pour collecter un deuxième
20 surnageant et un deuxième culot qui est également soniqué, puis à nouveau centrifugé pour collecter un troisième surnageant, les surnageants de sonication sont réunis et déposés sur une colonne de tamis moléculaire à partir de laquelle on recueille, en utilisant l'acétate d'ammonium comme éluant, des fractions dont les poids moléculaires
25 sont évalués de manière appropriée et dont l'activité lymphoproliférative est évaluée à l'aide de tests appropriés.

23.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que les fractions recueillies sont au nombre de 7, les fractions F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, F₆ et F₇.

30 24.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que les poids moléculaires desdites fractions sont évalués par révélation au nitrate d'argent d'un gel PAGE-SDS.

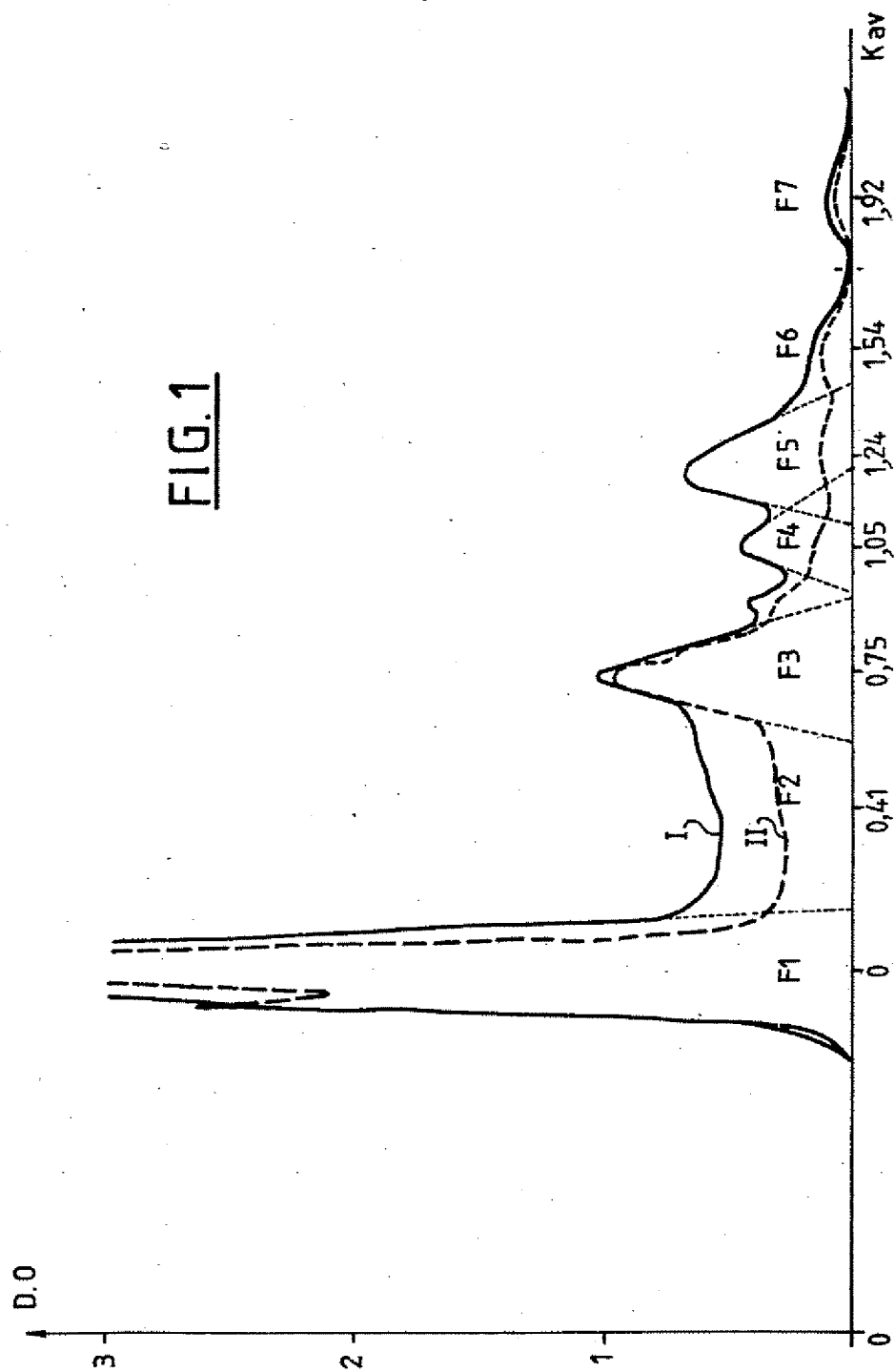
25.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisé en ce que le milieu de
35

culture mis en oeuvre pour la préculture et/ou pour la culture de promastigotes de *Leishmania* est avantageusement constitué par un mélange 1:1 de milieu RPMI 1640 et de milieu 199, additionné de 2 à 10 % de sérum de veau foetal 5 décomplémenté, de glutamine 2 mM, de tricine pH 7, 50 à 100 mM et d'antibiotiques appropriés.

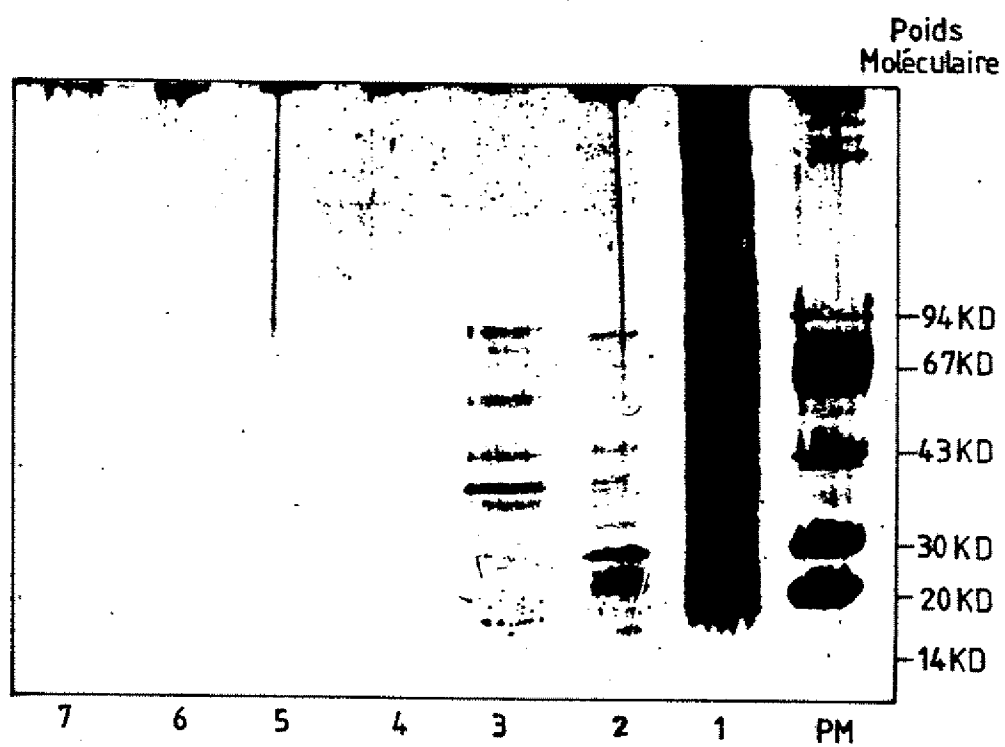
26.- Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que les opérations de mise en suspension et de centrifugation sont réalisées de préférence à une température 10 de l'ordre de +4°C environ.

27.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 ou 21, caractérisé en ce que l'étape de préculture est supprimée, auquel cas on utilise comme inoculum, 500 à 1000 ml de la culture résiduelle provenant 15 d'une culture précédente.

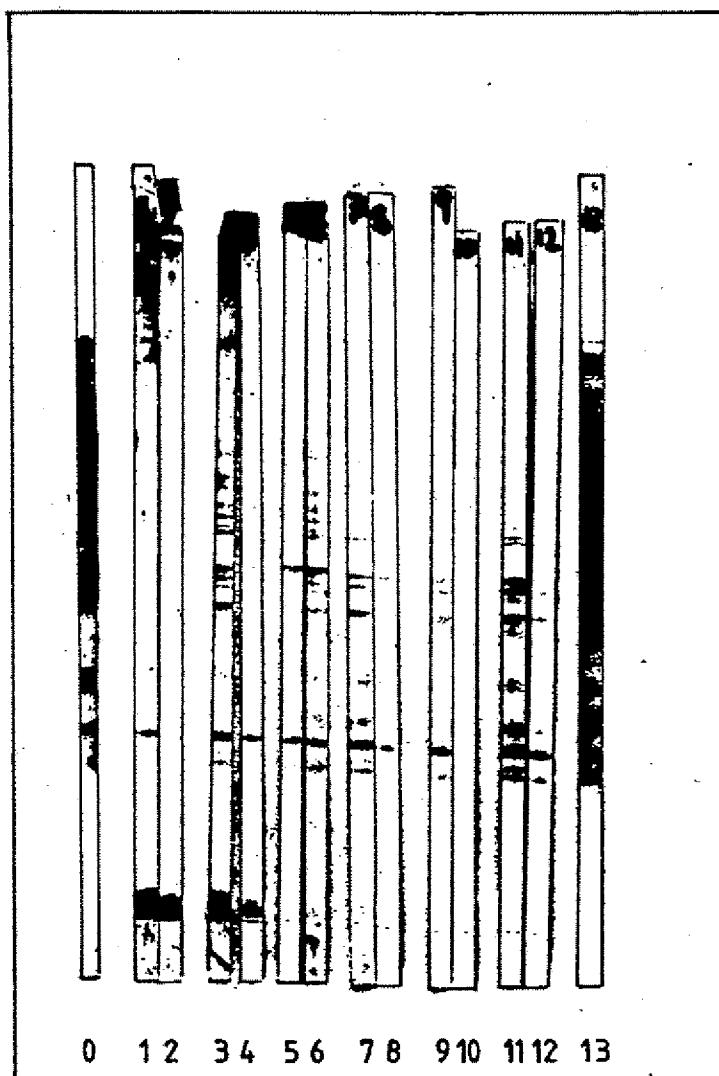
1 / 3

FIG.1

2/3

FIG. 2

3/3

FIG. 3